

Corres. to English translation of originally filed  
PCT application (PCT/JP02/08619)

D21

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 3 月 6 日 (06.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/018690 A1

(51) 国際特許分類: C08L 77/00, C08G  
69/44, A61K 47/30, 47/48, A61P 43/00

文京区 本駒込 2-3 3-1 1 アネックス K102 号  
Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08619

(74) 代理人: 小田島 平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.);  
〒107-0052 東京都港区 赤坂 1 丁目 9 番 1 5 号 日本  
自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2002 年 8 月 27 日 (27.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-256125 2001 年 8 月 27 日 (27.08.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会  
社 先端科学技術インキュベーションセンター (CEN-  
TER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOL-  
OGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京  
都千代田区丸の内 1 丁目 5 番 1 号 新丸の内ビルヂ  
ング 6 階 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ  
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特  
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片岡 一則  
(KATAOKA, Kazunori) [JP/JP]; 〒165-0031 東京  
都中野区上鷺宮 5-1 7-2 2 Tokyo (JP). 柿澤 資訓  
(KAKIZAWA, Yoshinori) [JP/JP]; 〒113-0021 東京

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING FINE PARTICLES FOR SUPPORTING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE THEREON OR HAVING THE SAME SUPPORTED THEREON AND METHOD FOR PREPARING THESE

(54) 発明の名称: 生物活性物質を担持するためのもしくは担持した微小粒子を含む組成物、ならびにそれらの調製方法

(57) Abstract: A dispersion containing organic/inorganic hybrid particles having a biologically active substance supported thereon, which is obtained by causing the biologically active substance to coexist with a system comprising a block copolymer represented by the general formula (I): PEG-block-poly(carbo) (wherein PEG represents a polyethylene glycol segment and carbo represents a repeating unit having carboxylate in a side chain) and an aqueous medium capable of forming hydroxyapatite.

(57) 要約:

一般式 (I) : PEG-block-ポリ (carbo) (ここで、PEG はポリエチレ  
ングリコールセグメントを示し、carbo は側鎖にカルボキシラートを有する  
繰返し単位を示す) で表されるブロック共重合体およびヒドロキシアパタイト  
を形成しうる水性媒体系で生物活性物質を共存させることにより得ることのでき  
る該活性物質を担持する有機-無機ハイブリッド型粒子を含有する分散体、なら  
びにその調製方法が提供される。

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/018690 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

生物活性物質を担持するためのもしくは担持した微小粒子を含む組成物、  
ならびにそれらの調製方法

技術分野

- 5 本発明は生物活性物質を担持するためのもしくは担持した有機-無機ハイブリッド粒子を含んでなる組成物、ならびにそれらの調製方法に関する。該生物活性物質は、好ましくは高分子多価陰イオン荷電性化合物（例、ポリ-もしくはオリゴヌクレオチド、ポリ-もしくはオリゴペプチドなど）であることができる。

背景技術

- 10 カルシウム水溶液とリン酸水溶液を、過飽和状態になるように混合したときに形成されるリン酸カルシウム（ヒドロキシアパタイト）の結晶は、DNAと結合する性質がある。この性質を利用し、リン酸カルシウムとDNAを共沈殿させる方法は、細胞内にDNAを導入する方法として広く利用されてきた。この方法の問題としては、至適条件の範囲が非常に狭く扱いが難しい、再現性が得にくい、  
15 などがある。特に、リン酸カルシウムの結晶の成長は非常に速く、巨大な結晶を形成してしまうため、カルシウム溶液とリン酸溶液を混合後、素早く細胞に作用させないと、DNA導入の効率が低下することが指摘されていた。また、ヒドロキシアパタイトはDNA等のポリヌクレオチド、その他のペプチドもしくはポリペプチド系の生物活性物質の吸着用基体（例えば、クロマトグラフィーの担体）  
20 としても用いられている。

- 上述のDNA（または遺伝子）の細胞への導入方法では、リン酸カルシウムの結晶の成長及びその粒径をコントロールする方法の開発が、DNAの導入効率上昇、再現性、保存安定性に対して重要であると考えられる。また、上記のDNAに限定されることなく、かような結晶に担持または吸着される物質を広く、各種  
25 の生物活性物質とすることができ、しかも、形成される粒径をコントロールすることができれば、薬物等を担持するのに広範に使用できる担体系または薬物のデリバリー系を提供する上でも重要であると考えられる。したがって、本発明の目的は、DNAの細胞への導入効率を高めるだけでなく、広く、コントロールされた粒径を有し、安定に生物活性物質を担持し、標的細胞または所望の組織もしくは

は局所に生物活性物質を都合よくデリバリーすることのできる粒子を形成するのに有用な組成物を提供することにある。

### 発明の開示

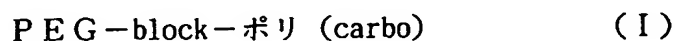
本発明者らは、カルシウムイオンとリン酸イオンを含む水溶液におけるリン酸カルシウム（主としてヒドロキシアパタイト）の結晶の成長および粒径を制御すべく研究してきた。その結果、親水性で非イオン性であるポリエチレングリコール（PEG）セグメントとカルボキシル基に由来するポリアニオン性セグメントを含んでなる特定のブロック共重合体の存在する水溶液において、DNAまたはその他の生物活性物質の共存下でカルシウムイオンとリン酸イオンとを反応させると、DNAまたはその他の生物活性物質が取り込まれたかまたは共存するリン酸カルシウム粒子をその粒径をコントロールしながら形成しうることを見出した。その上、かかる粒子の粒径は、必要によりサブミクロンオーダー（数100 nm）以下にも制御できるとともに、かような粒子を含有する水性分散系は、周囲条件下では沈殿を生ずることなく、安定に貯蔵できることが確認された。また、このような水性分散系は乾燥型の（例えば、凍結乾燥された）組成物とし、その後、同様な水性分散系に再構成しうることも見出された。

したがって、本発明によれば、一般式（I）



（式中、PEGはポリエチレングリコールセグメントを示し、そして carbo は側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す）  
で表される構造を含んでなるブロック共重合体、カルシウムイオン（ $\text{Ca}^{2+}$ ）およびリン酸イオン（ $\text{PO}_4^{3-}$ ）を必須成分として含んでなる生物活性物質を担持する有機-無機ハイブリッド型粒子を形成するための（または形成するのに用いるための）水性組成物が提供される。

また、別の態様の本発明として、一般式（I）



（式中、PEGはポリエチレングリコールセグメントを示し、そして carbo は側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す）  
で表される構造を含んでなるブロック共重合体、カルシウムイオン（ $\text{Ca}^{2+}$ ）、

リン酸イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) および生物活性物質から生成される該生物活性物質を担持する有機-無機ハイブリッド型粒子を含んでなり、該粒子の平均粒子径が50~600nmである組成物が提供される。

さらにまた、かような生物活性物質を担持する有機-無機ハイブリッド型粒子を形成するための水性分散組成物および生物活性物質を担持する該粒子を含んでなる組成物の調製方法、ならびに、該組成物を培養細胞の共存下でインキュベートするか、動物の適当な部位に注入する段階を含んでなる、該生物活性物質、特に、ポリ-もしくはオリゴヌクレオチドを細胞内に導入する方法も提供される。

なお、従来、 $\text{CaCl}_2$  を添加後の修飾されたPEO-block-PMAA (PEOは、ポリエチレンオキシドまたはポリエチレングリコールセグメントであり、PMAAはポリメタクリル酸セグメントであり、PMAAのうち、3個が $\text{C}_{12}$ -アルカンにより修飾されている) の凝集溶液にリン酸イオンを加えると、ニューロン様の構造をもつヒドロキシアパタイト/PEG-block-PMAA- $\text{C}_{12}$ のハイブリッド型の構造物が得られることが知られている (Hebnur Coelfer, Macromol. Rapid Commun. 2001, 22, 219-252)。

本願発明によれば、生物活性物質がさらに担持されるか、不存在であるかにかかわらず実質的に球形の粒子が提供され、これらの粒子はエンドサイトーシスにより細胞内へ効率よく取り込まれるのに適度の粒径を有し、かつ粒径の分布の狭い均一な粒子を形成することのできる手段が提供される。生物活性物質が不存在の粒子は、微細な粒子からなる新たな形態のヒドロキシアパタイト材料として有用であろう。また、生物活性物質を担持する粒子を含む系は、生物活性物質の標的へのデリバリーや該物質の有用性の範囲の拡大をもたらすであろう。

#### 図面の簡単な説明

図1は、CaPの結晶成長に対するPAAおよびPEG-PAAの影響を示すグラフである。(a)は、PAA存在下での透過率の経時変化を示すグラフである (PAA濃度: (□)  $14\mu\text{g/mL}$ 、(◇)  $14\mu\text{g/mL}$ 、(○)  $43\mu\text{g/mL}$ 、(△)  $57\mu\text{g/mL}$ )、(b)は溶液混合3分後の透過率 ((□) PAA、(○) PEG/PAA (ブレンド)、(△) PEG-PAA)

図2は、動的光散乱測定によるCaP粒子の粒径測定の結果を示すグラフであ

る。

図3は、PEG-PAA濃度に対するCaP粒子の多分散度の変化を示すグラフである。

図4は、粒子の調製に際してDNAを添加することなく調製された粒子に関する、図2および3と同様な測定結果を示すグラフである。

図5は、HPLCによるCaP粒子に内包されたDNAの定量結果を示す溶出パターン。(a)上; DNAのみ (b) PEG-PAA濃度に対する内包DNA量の変化を示すグラフである ((○) 溶離液1、(△) 溶離液2)。

図6では、A) はDNAのみを細胞に作用させた後の細胞の状態を表す図面に代わる顕微鏡写真である。ここでは、エンドサイトーシスによる取り込みを示唆する顆粒状の蛍光が観察される。

B) はCaPの沈殿 (PEG-PAA  $70 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を細胞に作用させた後の細胞の状態を表す図面に代わる顕微鏡写真である。ここでは、沈殿が細胞表面に吸着したことを示す像が得られている。

図7では、C) はCaP粒子 (PEG-PAA  $280 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (PMA非共存下) を細胞に作用させた後の細胞の状態を表す図面に代わる顕微鏡写真である。ここでは、CaP粒子のエンドサイトーシスによる取り込みを示唆する顆粒状の蛍光が観察される。

PEG-PAA濃度  $140 \mu\text{g}/\text{ml}$  でも同様の結果が得られた。

D) はCaP粒子 (PEG-PAA  $280 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (PMA共存下) を細胞に作用させた後の細胞の状態を表す図面に代わる顕微鏡写真である。ここでは、CaP粒子がエンドサイトーシスによって取り込まれたことを示唆する顆粒状の蛍光とともに、核への局在化を示す蛍光像が得られている。

図8では、E) は蛍光分子ローダミンのみを細胞に作用させた後の細胞の状態を表す図面に代わる顕微鏡写真である。ここでは、細胞質全体に蛍光がみられ、蛍光分子が核に選択的に移動していないことを示す。

図9の(a)は、例9による共重合体濃度とリン酸濃度の変化により、本発明に従う有機-無機ハイブリッド型粒子の粒径が変化することを示すグラフであり、

そして (b) はそれぞれの粒子の多分散度を示すグラフである。

図 10 は、粒子の DNA 内包量の共重合体およびリン酸濃度の依存性を示すグラフである。

図 11 の (a)、(b) および (c) は、例 8 において細胞への DNA の取り込みについて評価した結果を示すグラフである。

図 12 は、例 9 により粒子の毒性を評価するために行った試験の結果を示すグラフである。

図 13 A および B は、例 10 におけるプラスミド DNA 内包粒子の細胞内での発現活性を検討した結果を示すグラフである。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

本発明によれば、共通して、リン酸カルシウム（ヒドロキシアパタイト）を生成する系において、一般式 (I)



(式中、PEG はポリエチレングリコールセグメントを示し、そして carbo は側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す) で表される構造を含んでなるブロック共重合体を使用することに特徴がある。

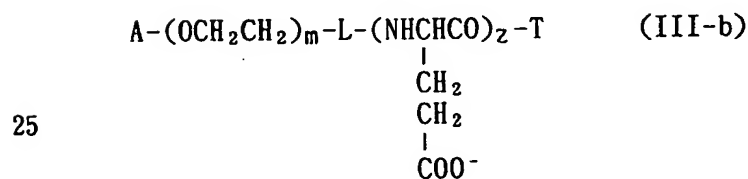
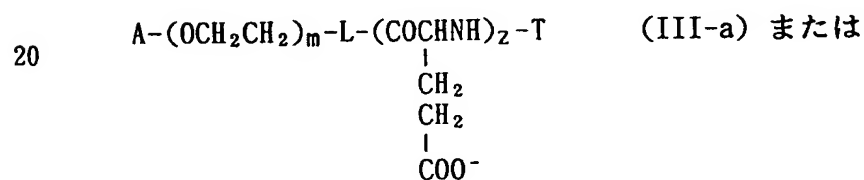
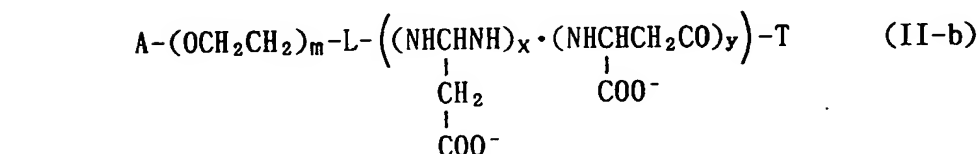
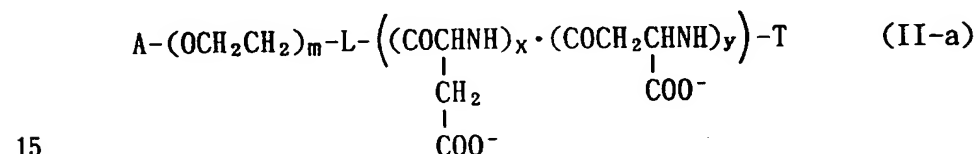
上記のごとく、本明細書において「リン酸カルシウム」または「ヒドロキシアパタイト」という場合は、主としてリン酸カルシウム ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) およびヒドロキシアパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ ) を含むカルシウム陽イオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) とリン酸陰イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) とから水溶液中で形成される塩の混合物を意味する。好ましくは、ヒドロキシアパタイト型の塩が 50 重量%以上含まれていることを企図している。

前記ブロック共重合体における一方のセグメントであるポリ (carbo) は、側鎖にカルボキシラートイオン ( $\text{COO}^-$ ) を有する繰り返し単位からなるポリマーセグメントを表し、本発明の目的に沿う限り、このような繰り返し単位を提供する出発原料の種類を問わない。しかし、好ましくは、アスパラギン酸、グルタミン酸、メタクリル酸、アクリル酸および N-アセチルヒアロビウロン酸（ヒアルロン酸の繰り返し単位）からなる群より選ばれる 1 種以上のカルボキシル基を含有する化合物に由来するを繰り返し単位とするものを挙げることができる。か

ようなポリ(carbo)は、前記ブロック共重合体の製造方法に応じて、一定のカルボキシル基がエステル(例えば、炭素原子6個までの低級アルキル、またはベンジルエステル)の形態にあることができる。かようなエステルの形態の残基は、本発明に従って、リン酸カルシウム(またはヒドロキシアパタイト)への該ブロック共重合体の取り込みまたは吸着が阻害されない限り、50%程度まで含まれていてもよいが、好ましくは10%未満、特に好ましくは0%である。

また、式(I)で表される「構造を含んでなる」とは、本発明の目的に沿う限り、PEGとポリ(carbo)との間の連結基、さらにはPEGもしくはポリ(carbo)の末端は如何なる基または部分をも含む得ることを意図している。

本発明で用いるのに特に好ましい、ブロック共重合体としては、下記の一般式(II-a)、(II-b)、(III-a)および(III-b)のいずれか一つの式によって表されるものを挙げるることができる。



各式中、各記号はそれぞれ独立した意味を有し、そして

Aは水素原子または置換もしくは未置換の炭素原子12個までのアルキル基を表し、



Lは単結合、NH、COまたは $X(CH_2)_pY$ であって、ここでXはOCO、OCONH、NHCO、NHCOO、NHCONH、CONHもしくはCOOを表し、YはNHもしくはCOを表し、pは1～6の整数を表し、

5 Tは水素原子、ヒドロキシル基または $-ZR$ であって、ここでZは単結合、CO、OもしくはNHを表し、Rは置換もしくは未置換の炭素原子12個までの炭化水素基を表し、

mは4～2500の整数であり、そして

10  $x+y$ または $z$ は5～300の整数であるが、但し、存在するカルボキシラートイオンは50%までカルボキシエステル残基を形成することができる。また、上記式(I I-a)および(I I-b)中の $\alpha$ -アスパラギン酸単位と $\beta$ -アスパラギン酸単位との間の「 $\cdot$ 」は、これらの単位がランダムに存在することを意味する。

なお上式中のmが12～2500の整数であり、そして $z+y$ または $z$ が5～50の整数であるブロック共重合体がさらに好ましく使用できる。

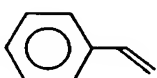
15 上式中の各基または各部分の定義は、より具体的には、次のごとき意味を有する。「炭素原子12個（以下、 $C_{12}$ のように略記する場合あり。このような記載様式は、他の炭素原子を有する基を表示する場合にも同様に用いられる。）までのアルキル基」とは、直鎖もしくは分岐鎖であってもよいアルキル基であって、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、 $i$ so-プロピル、 $n$ -ブチル、 $se$   
20  $c$ -ブチル、 $n$ -ペンチル、 $n$ -ヘキシルおよび $n$ -もしくは $i$ so-ドデシルを表す。このようなアルキル基の置換基としては、本発明の目的に沿う限り、どのような基であってもよいが、好ましくは、ヒドロキシル基、カルボキシル基、式  $R^1R^2CH-$ （ここで、 $R^1$ および $R^2$ は独立して、 $C_{1-10}$ アルキルオキシ、アリールオキシもしくはアリール- $C_{1-3}$ アルキルオキシを表すか、一緒になっ  
25 て $C_{1-6}$ アルキルで置換されていてもよいエチレンジオキシ（ $-O-CH(R')-CH-O-$ 、ここで、 $R'$ は水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基である）を表わす）の基、式  $R^{1'}R^{2'}NCH_2-$ （ここで、 $R^{1'}$ および $R^{2'}$ は独立して、有機シリル型のアミノ保護基、例えばトリアルキルシリル基または $R^{1'}$ および $R^{2'}$ はそれらが結合する窒素原子と一緒にあって、4～7員環のジシラーアザシクロヘ

テロ環式環を形成しうる原子団である)の基を挙げることができる。例えば、式  $R^1R^2CH-$  の基は、所謂、アセタールもしくはケタール部分を示し、緩和な加水分解によって、容易に  $OCH-$  (アルデヒド基)に転化できる。他方、式  $R^{1'}R^{2'}NCH_2-$  の基は、例えば、テトラアルキルアンモニウムフロリドを含む溶液中で容易に  $H_2N-$  に転化できる。したがって、このような置換基を有する一般式 (I)、(II-a)、(II-b)、(III-a) または (III-b) で表されるブロック共重合体は、それらを用いて、本発明に従う有機-無機ハイブリッド型粒子 (例えば、ポリマーミセル) を形成した後、通常、該粒子のシェルまたは表面に存在する上記の置換基をアルデヒド基またはアミノ基に転化し、こうして得られた官能基を介して、例えば、抗体等の特異的な結合性を示すポリペプチドを該粒子に共有結合するのに好都合である。こうして該粒子は標的指向性を付与することもできる。このような置換基を有する PEG セグメントの取得方法は既知であり、例えば、 $R^1R^2CH-$  基の場合は、WO 96/33233 (または対応する US-A-5,925,720) を参にすることができる。

また、上記のブロック共重合体には、それ自体公知のものから選ぶことができるが、例えば、特開平 6-107565 号公報に記載される方法に従って、初ず、ポリエチレングリコールセグメントを生成し、次いでポリ (アミノ酸) セグメントを生成するか、あるいは WO 97/06202 に記載される方法に従って、初ず、ポリエチレングリコールセグメントを生成し、次いでポリ ((メタ) アクリル酸) セグメントを生成することにより、製造できる。別法として、PEG セグメントとポリ (carbo) セグメントとの間も、必要により、それ自体公知の連結基が存在してもよい。なお、これらの製造方法によって得られるものに上記共重合体が限定されるものでなく、予じめ、独立して両セグメントを構成するポリマーを製造しておき、それらを適当な方法で連結して得ることのできる共重合体も本発明で使用できる。

こうして取得されるブロック共重合体は、上式 (II-a)、(II-b)、(III-a) および (III-b) における T またはそれに相当する末端基は、通常、水素原子またはヒドロキシル基であるが、これらの末端基にそれ自体既知

の方法で-ZR基を導入することができる。このようなRとしては、限定されるものでないが、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH=CH_2$ 、 $-C(CH_3)=CH_2$ 、

$-CH_2$  、等の炭化水素基を挙げることができる。このような基の

5

導入方法も、上記のUS-A-5,925,720に記載の方法に従って実施できる。

本発明に従い、有機-無機ハイブリッド型粒子に担持（もしくは内包）することを予定するか、または担持（もしくは内包）させた生物活性物質は、理論に拘束されるものでないが、ブロック共重合体（特にカルボキシラートイオン）とカルシウムイオンまたはヒドロキシアパタイトとが形成する複合体または架橋マトリックス中に封入ないしは吸着されうる有機化合物であれば、いかなる生物活性物質であってもよい。しかし、好ましくは、ポリマーもしくはオリゴヌクレオチド（DNAもしくはRNAまたはそのペプチド誘導体等も包含する概念で使用している）およびポリマーもしくはオリゴペプチドまたはその誘導体からなる群より選ばれうるいずれの生物活性物質であってもよい。このようなDNAとしては、それ自体既知のがん抑制遺伝子その他、生体の恒常性を維持するのに必要な遺伝子、その他の特定遺伝子のアンチセンス等であることができる。本発明に従えば、これらの遺伝子を効率よく標的細胞に導入することができる。また、このような遺伝子を担持する有機-無機ハイブリッド型粒子と組み合わせて、または独立して使用するために、生物活性物質として、細胞の分化促進や増殖抑制、アポトーシスを誘導することが知られている増殖因子であるポリペプチド（単純もしくは糖鎖を有するタンパク質を包含する）を、該粒子に担持させる生物活性物質として選ぶこともできる。これらの生物活性物質としては、例えば、 $TGF-\beta_1$ 、 $TGF-\beta_2$ 、 $TGF-\alpha$ 、結合組織活性化ペプチド、腫瘍壊死因子、インスリン様増殖因子、インターロイキン、コロニー刺激因子、神経増殖因子を挙げることができる。

25

これらの増殖因子の中には、創傷治癒に有効なものがあり、それらを担持する本発明の有機-無機ハイブリッド型粒子は、それらを創傷部位に適用し、創傷治

癒を促進するのに用いることもできる。さらに創傷治癒に関連して、または無関係に、血液凝固因子、例えば、トロンビン等を生物活性物質として該粒子に担持させると、カルシウムイオンと協同して、または協同することなく、止血を促進するのに用いることもできる。このようなトロンビンを担持（または内包）する

5 粒子は乾燥状態もしくは濃厚懸濁液状態で創傷部に施用すると、出血してくる血液中に存在するフィブリノーゲンに働いてフィブリンを生成し、所謂、その場（in situ）での止血をもたらすであろう。したがって、このような粒子を含む組成物は止血用組成物として有用である。

その他の生物活性物質として、該粒子に担持することができる限り、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗ヒスタミン剤、抗腫瘍剤、骨誘導剤等を、本発明に従って、該

10 粒子に担持してもよい。

本発明によれば、かようなブロック共重合体、ならびにカルシウムイオンおよびリン酸イオンを必須の成分として含んでなる上記の生物活性物質を担持する有機-無機ハイブリッド型粒子を形成するための水性分散組成物が提供される。ここにいう「水性分散組成物」または後述する「水性分散体」とは、水を主たる溶媒とし、場合によって、水と混和性の有機溶媒（例えば、メタノール、エタノール、アセトン等）を本発明の目的を達成する上で悪影響を及ぼさない範囲内で少量含んでもよい溶媒系からなる溶液、分散液、懸濁液を意味する。これらの液には、pHを6.8～7.8に調節することのできる緩衝剤が含まれていることが好ましい。これらの液に含まれるカルシウムイオンおよびリン酸イオンは、それぞれ相当する水溶性の塩に由来するものであることができ、典型的には、前者は塩化カルシウムから、そして後者はリン酸水素二ナトリウムから誘導される。

15 20

カルシウムイオンとリン酸イオンの含有割合は、本発明においては、かなり重要であり、両者が反応してヒドロキシアパタイト（ $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ ）を生成するのに必要な当量より、過剰な量でカルシウムイオンが存在することが必要である。具体的には、 $\text{Ca}^{2+}$  対  $\text{PO}_4^{3-}$  は、モル濃度で、50～200対1であることができる。このような割合でカルシウムイオンとリン酸イオンが存在すると、前記ブロック共重合体が都合よくリン酸カルシウム（ヒドロキシアパタイト）と相互作用し、結合もしくは架橋または吸着される。

25

さらに、前記水性組成物中において、 $\text{Ca}^{2+}$  は、限定されるものでないが、  
60 mM～300 mMで、そして $\text{PO}_4^{3-}$  は、限定されるものでないが、0.4  
mM～10 mMで存在できる。またこのような割合は、本発明に従う、前記水性  
組成物に生物活性物質を含め、かような生物活性物質を担持もしくは内包する有  
機-無機ハイブリッド型粒子を含んでなる水性分散体を提供するにも好適である。  
5 具体的には、ブロック共重合体および前記生物活性物質とが適度にリン酸カルシ  
ウム（ヒドロキシアパタイト）と相互作用し、結合もしくは吸着される。なお、  
例えば、本発明にいう、「生物活性物質を担持する・・・粒子」とは、生物活性  
物質の一部もしくは全部が粒子の内部に内包されているか、または一部もしくは  
10 全部が粒子表面の存在している状態の粒子を意味する。

他方、前記水性組成物中で、ブロック共重合体は、限定されるものでないが、  
10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で存在することができる。前記水性組成物中  
の上述の $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{PO}_4^{3-}$  の濃度と、直前に記載したブロック共重合体の  
濃度は、該水性組成物中で形成される有機-無機ハイブリッド型粒子（生物活性  
15 物質不含）または、水性分散体における有機-無機ハイブリッド型粒子（生物活  
性物質含有）を水性液中で一般的に安定に分散させておくのに好都合である。し  
かし、上述の濃度を超える濃度で各成分を用いても、本発明の目的に沿う水性組  
成物または水性分散体を提供できる。また、このような水性分散体は、常法によ  
り、例えば、凍結乾燥法により乾燥形態にすることができる。このような乾燥形  
20 態の組成物は水性媒体で、再度、安定な水分散体に構成することもできる。また、  
乾燥形態のまま、必要により他の結合剤等を用いて、他の形態の製剤に調製する  
こともできる。

なお、上記の有機-無機ハイブリッド型粒子（生物活性物質を不含）は、均一  
な粒径の微小または微細なサブミクロンオーダーのヒドロキシアパタイトを形成  
25 するのに用いることができる。このような粒子は、必要により過剰な $\text{Ca}^{2+}$  な  
どを透析除去した後、例えば、凍結乾燥することにより得ることができる。

すでに、部分的には上記で言及してきた本発明に従う水性分散体は、上述の水  
性組成物に生物活性物質を共存させることにより調製できる。より具体的には、  
限定されるものでないが、（A）生物活性物質、カルシウムイオンおよび必要に

より緩衝剤を含む第一の水溶液を調製し、独立して、(B) 一般的 (I)

PEG-block-ポリ(carbo) (I)

(式中、PEGはポリエチレングリコールセグメントを示し、そして carbo は側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す)

- 5 で表される構造を含んでなるブロック共重合体、リン酸イオンおよび必要により緩衝剤を含む第二の水溶液を調製し、そして

- (C) 前記第一の水溶液と第二の水溶液を、ヒドロキシアパタイトが生成するのに十分な条件下で混合することにより調製できる。なお、第二の水溶液には塩化ナトリウムなどの塩を含めることができ、使用する場合の緩衝剤は、最終分散液の pH を 6.8 ~ 7.8 に調節することができるように選ぶのがよい。

- かような調製方法に限定されるものでないが、本発明に従う、水性分散体に含まれる粒子は、上述したブロック共重合体、カルシウムイオン、リン酸イオンおよび生物活性物質から生成される該生物活性物質を担持する粒子であって、平均粒子径が 50 ~ 600 nm である。本発明の上記調製方法によれば、例えば、ブロック共重合体濃度を選ぶことにより、粒子径が 50 ~ 600 nm のいずれかの大きさをもち、多分散度が 0.1 以下の極めて均一の粒子を含んでなる水性分散体を提供できる。勿論、必要があれば、調製時間を延長することにより 600 nm を越え数  $\mu$ m オーダーの粒子を形成することもできる。これらの水性分散体は、周囲条件下 (例えば、室温など) において、数日間 ~ 1 ヶ月間実質的に沈殿もしくは相分離を起こすことなく貯蔵できるので、そのまま、必要により、余剰のイオン低分子化合物などを透析もしくは限外濾過することにより除去し、注射用組成物として用いることも可能である。

- かような粒子中に担持させることのできる生物活性物質は、上述したが、概括的には、動物 (特に、ヒト) の生体内で何等かの有用な活性を示すことができる化合物であって、外来の活性ペプチドをコードするポリヌクレオチド (DNA、mRNA などを含む) や、特定の遺伝子の発現を助長もしくは制御するような機能をコードするポリヌクレオチド、さらにはアンチセンス DNA、リボザイムなどのポリヌクレオチドならびにポリペプチド (タンパク質、目的に沿う限りオリゴペプチドを含む) であることができる。本発明の作用上、これらのペプチド類

は多価カルボキシル基を含むことが好ましい。

限定されるものでないが、本発明に従う有機-無機ハイブリッド型粒子は、これらの粒子の総重量当たり、典型的には、

- 5       ブロック共重合体を30～70重量%、  
      ヒドロキシアパタイトを25～65重量%、および  
      生物活性物質を0.1（好ましくは1）～15重量%  
      を含んでなる。

また本発明に従う、上記水性分散体の調製方法は、培養細胞の存在下で特定の態様で実施することにより、例えば、

- 10    (A)   一般式 (I)



（式中、PEGはポリエチレングリコールセグメントを示し、そして carbo は側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す）

- 15       で表される構造を含んでなるブロック共重合体、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ )、  
      リン酸イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) およびを生物活性物質から生成される該生物活性物質  
      を担持する有機-無機ハイブリッド型粒子を含んでなり、かつ、該粒子の平均粒  
      子径が50～600nmであり、該生物活性物質がポリ-もしくはオリゴヌクレ  
      オチドおよびポリ-もしくはオリゴペプチドからなる群より選ばれる水性分散  
      体を、動物細胞の培養物中に添加し、そして

- 20    (B) (A) で調製された培養物をインキュベーションすることを特徴とする動物細胞内へのポリヌクレオチドの導入方法として提供できる。

- 25       かような方法によれば、前記粒子の形成の際にブロック共重合体濃度を低くすることにより、生理条件下で粒子が徐々に溶解し、一方、ブロック共重合体濃度を高めることにより、生理条件下で粒子を安定に保持することができ、標的部分での生物活性物質の放出時間を制御することも可能である。また、生物活性物質としての、例えばDNAは、前記有機-無機ハイブリッド型粒子として細胞内に取り込まれるが、細胞内のヌクレアーゼなどによる分解を回避して、細胞内の核に送達することもできる。このような細胞内へのDNAの取り込み効率の高さは、本発明の組成物を生体の適当な部位に注入した場合、すなわち、in vivoの系で

も達成できる。

以上に示してきたとおり、本発明によれば、生物活性物質の担体となりうる有機-無機ハイブリッド型粒子を含む水性分散体または乾燥形態の組成物として提供でき、またはその提供に用いるための水性組成物、ならびにこれらの調製方法

5 が提供できる。

以下、説明を簡略化するために特定の態様の本発明を例示しつつ、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明をこれらに限定することを意図するものではない。

#### 例1. ブロック共重合体の作用・効果の確認実験

10 この実験は、リン酸カルシウム（以下、CaPと略記する）の沈殿形成の阻害またはある一定以下の粒径の粒子のコントロールされた生成に、特定のブロック共重合体があることを示すものである。

#### <実験方法>

(1) 以下の水溶液を調製した。

15 溶液A : DNA (16mer : 70  $\mu$ g/mL)

1/10 TE緩衝剤 (pH 7.6)

Ca<sup>2+</sup> 250mM (CaCl<sub>2</sub>を用いる)

溶液B : PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 1.5mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を用いる)

Hepes緩衝剤50mM (pH 7.05)

20 NaCl 140mM

ポリ(アスパラギン酸)ホモポリマー(以下、PAAと略記する)

もしくはPEG-block-ポリ(アスパラギン酸)(以下、PEG-PAAと略記する。PEG分子量12000、PAA重合度24)

上記で、PAAはポリ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-DL-アスパラギン酸であり、分子量2000~10000(重合度15~77)(SIGMAより入手)を用い、PEG-PAAは、

次式、  $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{COCH}(\text{CH}_2\text{COO}^-)\text{NH})_x \cdot$

$(\text{COCH}_2\text{CH}(\text{COO}^-)\text{NH})_y\text{H}$

で表され、PEGセグメントの分子量が約12000であり、PAAセグメント



の重合度 (x + y) が 24 であるものを製造して用いた。

(2) 溶液 A と溶液 B を 37℃ で混合し、波長 350 nm の光の透過率から濁度変化を追跡した。

< 結果 >

- 5      結果を図 1 に示す。PAA の単独重合体を添加した場合、溶液の混合直後から透過率が急激に減少した。その程度は、PAA 濃度依存的であり、ポリマー濃度が高いほど、透過率は大きく減少した (図 1 a)。また、ここに PEG が共存していても、透過率に変化はなく、PEG が沈殿と相互作用しないことが示唆された (図 1 b)。一方、ブロック共重合体存在下では、透過率はほとんど変化せず、
- 10      沈殿の形成を抑制することが示された。これらの結果から、DNA 内包 CAP の沈殿の抑制には共重合体構造が必要であることが明らかである。

#### 例 2. DNA とリン酸カルシウムの複合体粒子の粒径 (その 1)

- 例 1 と同様に溶液 A と溶液 B とを混合して、複合体粒子を含有する水性分散体を調製した。ただし、混合後一晩、37℃ で温置した後、分散体の動的光散乱測定 (DLS) により粒径を評価した。
- 15

- 測定装置としては、大塚電子の DSL-7000 を用いた。アルゴンレーザーの波長 488 nm の光を入射光として使用し、測定は 25℃ で行った。入射光に対する角度 90° 方向の散乱光を検出し、その強度変化の時間依存性をキュムラント法により解析して粒子の拡散係数を求めた。得られた拡散係数は、Stokes-Einstein の下記式により粒径へと変換した。
- 20

$$R = kT / (6\pi\eta D)$$

式中、R = 粒径、k = ボルツマン定数、T = 温度、 $\eta$  = 粘性係数、D = 拡散係数

< 結果 >

- 動的光散乱測定による CAP 粒子の測定結果を図 2 に示す。粒子の形成が DLS 測定により確認された。その粒径は、PEG-PAA 濃度 70  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で 125 nm であり、共重合体濃度増加とともに減少し 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で約 90 nm となった。その後粒径はポリマー濃度増加とともに再び上昇した。
- 25

また、粒子の粒径分布の大きさの指標となる多分散度は、同じくキュムラント法によりもとめたところ 0.1 以下であった。この値は、規格化した拡散係数の

偏差であり、コロイド粒子においては、0.1以下であると一般に単分散であるとみなされる。図3参照のこと。

### 例3. DNA不含のリン酸カルシウムの複合体の粒径

複合体粒子の製造に際し、例1の溶液AからDNAを除いたものに相当する溶液を使用したこと以外、例2と同様の操作をくり返した。結果を図4に示す。粒子径および粒子の多分散度は例2のものと、ほぼ同一である。

### 例4. 粒子中に取り込まれている(または内包された)DNA量の決定(その1)

CaP粒子は、例2と同じ条件で調製した。調製した水性分散体を下記の条件の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供し、DNAの定量を行った。

10 HPLC条件: カラム Superose 6 HR (室温)

溶離液1 CaCl<sub>2</sub> 125mM, 140mM NaCl, 50mM  
HEPES, pH7.4

溶離液2 CaCl<sub>2</sub> 200mg/L (カルシウムイオン 1.8mM),  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 125mg/L (リン酸イオン 0.9mM),  
15 NaCl 6400mg/L, HEPES 5958mg/L,  
pH7.4。

検出 UV260nm

#### <結果>

HPLCの測定結果を図5に示す。DNA単独では、溶出時間30分付近にDNAに由来するピークが見られた。一方、CaP溶液では、DNAのピークとともに12分付近に粒子のピークが確認された。粒子に内包されたDNAの割合は、両者の比から算出した。

溶離液1の条件下では、PEG-PAA濃度70μg/mLでの内包量45%から、濃度増加と共に減少していった。

25 生理条件に近い溶離液2を用いた場合は、ポリマー濃度が低いところでは、粒子が徐々に溶解することが示唆された。一方、濃度が高いところでは、粒子は生理条件下でも安定であることが示唆された。

なお、生成するCaP粒子の組成重量比は、以下のように換算できる。

カルシウム 125 mM、リン酸 0.75 mM の溶液中では、カルシウムが大過剰で、リン酸分子が全て CaP になっているとすると、CaP の組成は  $\text{Ca}_2(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$  であるので、CaP 重量濃度は  $126 \mu\text{g}/\text{ml}$  となる (表 1)。  
 また、添加した PEG-PAA もすべて CaP に吸着していると仮定すると、組成比は表 2 のようになる。

表 1 CaP 粒子溶液の成分の重量濃度

試料番号	PEG-PAA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Cap ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	DNA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	合計 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
1	70	126	16	212
2	140	126	11	277
3	210	126	7	343
4	280	126	5.3	411

表 2 Cap 粒子の成分組成比

評価番号	PEG-PAA/重量%	Cap/重量%	DNA/重量%
1	33	60	7.4
2	51	46	3.8
3	61	37	2
4	68	31	1.3

なお、上記実験で記載した溶離液 1 および 2 をそれぞれ使用した目的は次のとおりである。

溶離液 1 について：溶離液 1 のカルシウム濃度 125 mM で CaP 粒子溶液と同じである。この条件では、カルシウム濃度はリン酸に対して大過剰であり、CaP 粒子が溶解しないと考えられる。ここでは、この溶離液を用い、調製した CaP 粒子中の DNA 内包量を決定した。

溶離液 2 について：生理条件下での粒子の安定性に影響を与える要素は、溶液中のカルシウムおよびリン酸の濃度である。ここでは、溶離液として、生理条件に近い濃度のカルシウムおよびリン酸を含有したものをを用い、生理条件下での粒

子の安定性を評価した。

#### 例5. 粒子中の内包DNAの細胞内での動態

CaP粒子の調製は例1と同様に行った。ただし、DNAはローダミンで蛍光標識した20merのものをを用いた。また、25℃で水性分散体を一晚温置した  
5 後、細胞に作用させた。

#### 細胞への作用実験

細胞株HuH-7（ヒト肝癌由来、理研ジーンバンクより入手）を、DMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）（GIBCO BRLより入手）に10%ウシ胎児血清を加えた培地を用い、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で37℃にて培養した。

10 なお、容量比で、培地9に対しCaP粒子含有水性分散体1の割合で、上記培養物に水性分散体を添加し、3時間培養したのち、培地を取り除き、PBSで3回洗浄した。これを共焦点レーザー顕微鏡LSM510（Carl Zeiss Co., Ltd製）で観察した。処理細胞の状態を示す図面に代わる写真を図6～8として添付する。

15 沈殿が形成する条件では、CaP/DNAが細胞表面に吸着した（\*DNA鎖長の違いのためPEG-PAA70μg/mlで沈殿が見られた）。一方、CaP粒子はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが、顆粒状の蛍光像から示唆された。

更に、粒子形成時にポリ（メタクリル酸）（分子量9500；Aldrich Chemical Company Inc.より入手）を添加すると（35μg/mL、DNA35μg/mL）、DNAは細胞内の核に局在することが示唆された。ローダミンのみでは細胞質に分布するため、この際DNAは、過度に分解していないと思われる。

#### 例6. DNAとリン酸カルシウムの複合体粒子の粒径（その2）

25 例2では、共重合体の濃度を変化させることにより複合体粒子の粒径を調節できることを示したが、本例では、共重合体の濃度とともにリン酸濃度を変化させることにより、該粒径がさらに調節できることを示す。

#### <実験>

（1）以下の溶液を調製した。

溶液A：DNA（16mer：70μg/mL）

1/10 TE 緩衝剤 (pH 7.6)

Ca<sup>2+</sup> 250 mM (CaCl<sub>2</sub> を用いる)

溶液 B : PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 1.5 mM、3.0 mM または 6.0 mM

(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を用いる)

5 Hepes 緩衝剤 50 mM (pH 7.05)

NaCl 140 mM

PEG-PAA (PEG 分子量 12000、PAA 重合度 24)

140-1400 μg/mL

(2) 溶液 A と溶液 B それぞれ等量を混合し、37℃で一晩静置後、動的光散乱  
10 測定により粒子の粒径および多分散度を決定。

<結果>

図9の(a)に示されるように溶液中のPEG-PAA、リン酸の濃度により  
形成される粒子の粒径は変化し、そして(b)に示されるように、いずれも多分  
散度0.1以下の粒径が100-300 nmの均一な粒子が得られた。

15 図9の(a)および(b)における□、◇および○は、それぞれリン酸濃度0.  
75 mM、1.5 mM および 3.0 mM に対応する。

例7 粒子中に取り込まれている(または内包された)DNA量の決定(その2)

例6に従って調製した粒子を、例4に記載したのと同様にDNAの内包量につ  
いて定量を行った。

20 <結果>

HPLCの測定結果を図10に示す。図から、リン酸濃度が増加するのに伴っ  
てDNA内包量が上昇する傾向が見られる。また、リン酸3.0 mM、PEG-  
PAA 540 μg/mL ではDNAの内包率90%に達した。溶離液1と2の結  
果を比較すると、カルシウム濃度、リン酸濃度が生体に近い溶離液2では内包率  
25 の減少が見られた。なお、図中、白抜きが溶離液1を用いたときの結果であり、  
塗りつぶしが溶離液2を用いたときの結果である。図内の数字はリン酸濃度を意  
味する。

例8 DNA内包粒子の細胞への取り込み

<実験>

## 1. 粒子調製条件

(1) 以下の溶液を調製した。

溶液A : DNA (16mer : 70  $\mu$ g/mL)

(5' 末端をFITC標識したもの)

5 1/10 TE 緩衝剤 (pH 7.6)

Ca<sup>2+</sup> 250 mM

溶液B : PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 6.0 mM

Hepes 緩衝剤 50 mM (pH 7.05)

NaCl 140 mM

10 PEG-PAA (PEG分子量12000、PAA重合度24)

1080  $\mu$ g/mL

(2) 溶液AおよびB等量を混合し、温度37℃で24時間静置した。

## 2. 細胞取り込み評価

15 HeLa細胞(ヒト子宮頸部癌細胞)を、24穴プレートに $2 \times 10^4$ /穴の細胞密度で蒔き、DMEM培地中(含10%FCS)で24時間培養した。その後、50  $\mu$ Lの粒子もしくはDNA試料を450  $\mu$ Lの培地(DMEM、10%FCS)に添加した。所定時間後、細胞をトリプシン処理ではがし、1-2 mLのPBSに分散させた(測定まで氷冷)。約 $2 \times 10^3$ の細胞をフローサイトメ

20 ゲートは、最も蛍光強度が強い未処理の細胞が1%含まれる様にかけた。未処理の細胞の蛍光強度の平均値は、0.5であった。

## &lt;結果&gt;

25 図11(a)、(b)および(c)に結果を示す。図から、上記実験条件下では、DNA単独では取り込みは殆ど見られない。一方、DNAを粒子に内包させることによって細胞への取り込みは大幅に増殖し、4時間でほぼ細胞の100%に核酸が取り込まれることが明らかとなった。細胞の平均蛍光強度をプロットした結果からも、DNA単独に対して粒子を利用することにより細胞への取り込みが大幅に促進されていることがわかる。

なお、図11の(a)は未処理細胞とCaP粒子で処理した細胞の典型的なヒ

ストグラム（24時間後）であり、

（b）は細胞のDNA取り込み量の時間変化（ゲート領域中にある細胞の％で表示したもの）を示すものであり、そして

（c）は細胞のDNA取り込み量の時間変化（平均蛍光強度で表示したもの）を示すものである。

#### 例9 粒子の毒性評価試験

##### <実験方法>

##### 1. 粒子調製条件

（1）以下の溶液を調製した。

10 溶液A：DNA（16mer：70 $\mu$ g/mL）

1/10TE 緩衝剤（pH7.6）

Ca<sup>2+</sup> 250mM

溶液B：PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 1.5mM

Hepes 緩衝剤50mM（pH7.05）

15 NaCl 140mM

PEG-PAA（PEG分子量12000、PAA重合度24）

140-560 $\mu$ g/mL

（2）溶液AおよびB等量を混合し、温度37℃で24時間静置した。

##### 2. 毒性試験

20 HeLa細胞（ヒト子宮頸部癌細胞）を、96穴プレートに5×10<sup>3</sup>/穴の細胞密度で蒔き、DMEM培地中（含10%FCS）で2日間培養した。その後、10 $\mu$ Lの粒子試料を90 $\mu$ Lの培地（DMEM、10%FCS）に添加した。24時間培養後、生細胞数をMTT（3-（4,5-ジメチル-2-チアゾリル）-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム ブロミド）アッセイによって計

25 数した。

MTTアッセイは次のように行った。

96穴プレートの1穴あたりMTT（5mg/mL（PBS））溶液を10 $\mu$ L添加し、37℃で2時間静置した。その後、20%SDS（DMF：水=1：1）を穴あたり100 $\mu$ L添加し、37℃で24時間静置した。560nmの吸

光度をプレートリーダーで測定した。

<結果>

結果を図12に示す。図12は未処理細胞に対する生細胞数のパーセンテージを棒グラフで表したものである。この図によると実験誤差範囲で未処理細胞と比較して生細胞数の減少は見られず、本実験条件下では、粒子は顕著な毒性を示さないことが明らかである。

例10 トランスフェクション実験

以下の実験では、粒子の内包核酸としてプラスミドDNA（ルシフェラーゼ遺伝子をコードしたもの）を用い、粒子の細胞への遺伝子導入能について検討を行った。

<実験方法>

1. 粒子調製

(1) 以下の溶液を調製した。

溶液A：プラスミドDNA（pGL3-Luc、5kbp）

(26-50  $\mu$ g/mL)

1/10 TE 緩衝剤（pH 7.6）

Ca<sup>2+</sup> 250 mM

溶液B：PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 1.5 mM

Hepes 緩衝剤 50 mM（pH 7.05）

NaCl 140 mM

PEG-PAA（PEG分子量12000、PAA重合度24）

100-200  $\mu$ g/mL

(2) 溶液AおよびB等量を混合し、温度25℃で24時間静置した。

2. トランスフェクション実験

293T細胞（ヒト腎臓）を6穴デッシュ（ゼラチンコート）に60%コンフルエントになるように蒔き、24時間DMEM培地（含10%FCS）中で培養した。培地を取り除いた後、細胞をPBSで洗い、新しい培地を添加した。その後、培地1mLに対しサンプルを100  $\mu$ L添加し、6時間培養した。培地交換後、更に24時間培養した。ルシフェラーゼ遺伝子発現量は、市販のアッセイキッ



トによって定量した。

<結果>

結果を図13AおよびBに示す。図13Aは遺伝子発現に対するPEG-PAA温度および6時間培養時の血清の有無の影響を調べた結果を示すものである。

- 5 PEG-PAA 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ と比較して4-6倍高い活性が認められた。また、PEG-PAA濃度が75、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ と増加していくと発現活性が減少することが明らかである。

50、75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の条件で、血清存在下では非存在下と比べて発現量は落ちているが、0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ より高いかもしくは同等の活性が得られている。

- 10 図13Bは遺伝子発現に対するプラスミドDNA濃度の影響を調べた結果を示すものである。

PEG-PAA濃度0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、プラスミドDNA濃度による顕著な発現の差は認められなかった。一方、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ではプラスミドDNA濃度の上昇とともに発現が上昇した。

- 15 産業上の利用可能性

本発明に従う有機-無機ハイブリッド型粒子は生物活性物質（例えばDNA）を例えば細胞内へ導入し、そして発現するのに有用である。従って、本発明は医療業および製薬業において利用可能である。

20

25

## 請求の範囲

## 1. 一般式 (I)

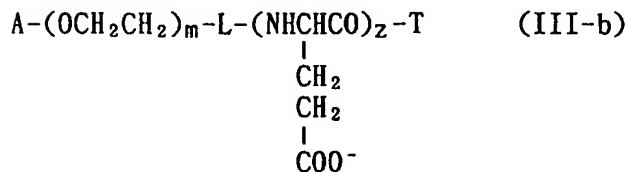
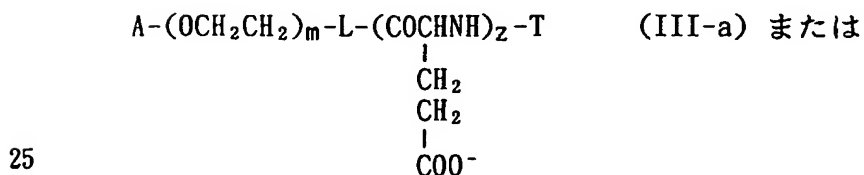
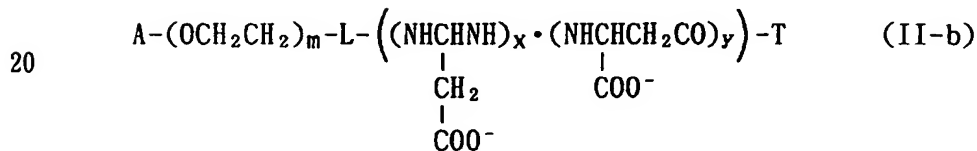
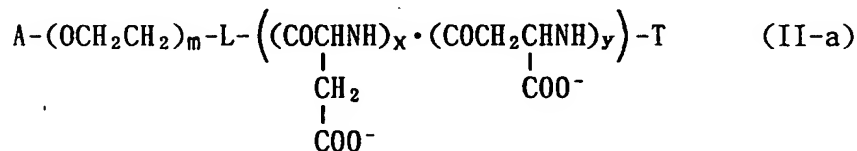


(式中、PEGはポリエチレングリコールセグメントを示し、そして carbo は  
 5 側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す)  
 で表される構造を含んでなるブロック共重合体、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) お  
 よびリン酸イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) を必須成分として含んでなる生物活性物質を担持  
 する有機-無機ハイブリッド型粒子を形成するための水性分散組成物。

2. カルシウムイオンが、リン酸イオンに対して、ヒドロキシアパタイトを生  
 10 成するのに必要な当量より過剰な量で存在する請求項1記載の組成物。

3. carbo がアスパラギン酸、グルタミン酸、メタクリル酸、アクリル酸およ  
 びN-アセチルヒアロビウロン酸からなる群より選ばれるカルボキシル基含有化  
 合物に由来する繰り返し単位である請求項1記載の組成物。

4. 該ブロック共重合体が、下記一般式 (II-a)、(II-b)、(III-a)  
 15 -a)および(III-b)のいずれか一つで表される請求項1記載の組成物：



各式中、各記号はそれぞれ独立した意味を有し、そして

Aは水素原子または置換もしくは未置換の炭素原子12個までのアルキル基を表し、

Lは単結合、NH、COまたは $X(CH_2)_pY$ であって、ここでXはOCO、O  
5 CONH、NHCO、NHCOO、NHCONH、CONHもしくはCOOを表し、YはNHもしくはCOを表し、pは1～6の整数を表し、

Tは水素原子、ヒドロキシル基または $-ZR$ であって、ここでZは単結合、CO、OもしくはNHを表し、Rは置換もしくは未置換の炭素原子12個までの炭  
化水素基を表し、

10 mは4～2500の整数であり、そして

$x+y$ または $z$ は5～300の整数であるが、但し、存在するカルボキシラ  
ートイオンは50%までカルボキシエステル残基を形成することができる。

5. mが12以上であり、そして $x+y$ または $z$ が50以下である請求項4記  
載の組成物。

15 6. 一般式(I)

PEG-block-ポリ(carbo) (I)

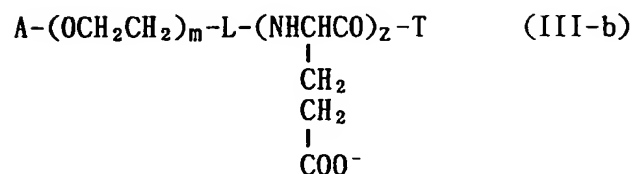
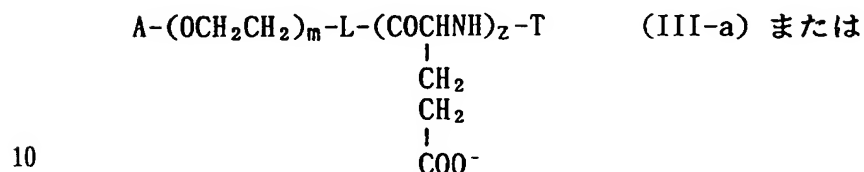
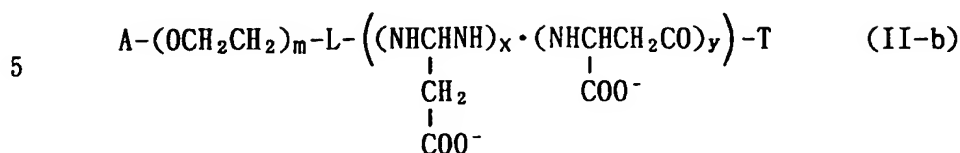
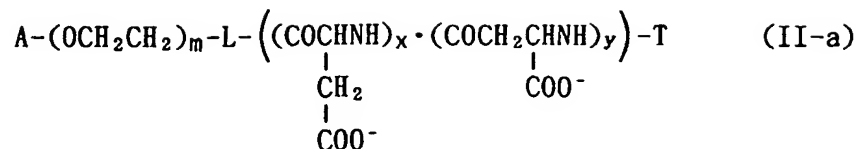
(式中、PEGはポリエチレングリコールセグメントを示し、そしてcarboは  
側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す)

で表される構造を含んでなるブロック共重合体、カルシウムイオン( $Ca^{2+}$ )、  
20 リン酸イオン( $PO_4^{3-}$ )および生物活性物質から生成される該生物活性物質を  
担持する有機-無機ハイブリッド型粒子を含んでなり、かつ、水性分散体中にお  
ける該粒子の平均粒子径が50～600nmである組成物。

7. カルシウムイオンが、リン酸イオンに対して、ヒドロキシアパタイトを生  
成するのに必要な当量より過剰な量で存在する請求項6記載の組成物。

25 8. carboがアスパラギン酸、グルタミン酸、メタクリル酸、アクリル酸およ  
びN-アセチルヒアロビウロン酸からなる群より選ばれるカルボキシル基含有化  
合物に由来する繰り返し単位である請求項6記載の組成物。

9. 該ブロック共重合体が、下記一般式(II-a)、(II-b)、(III  
-a)および(III-b)のいずれか一つで表される請求項6記載の組成物：



15 各式中、各記号はそれぞれ独立した意味を有し、そして

Aは水素原子または置換もしくは未置換の炭素原子12個までのアルキル基を表し、

20 Lは単結合、NH、COまたはX(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Yであって、ここでXはOCO、CONH、NHCO、NHCOO、NHCONH、CONHもしくはCOOを表し、YはNHもしくはCOを表し、pは1～6の整数を表し、

Tは水素原子、ヒドロキシル基または-ZRであって、ここでZは単結合、CO、OもしくはNHを表し、Rは置換もしくは未置換の炭素原子12個までの炭化水素基を表し、

mは4～2500の整数であり、そして

25 x+yまたはzは5～300の整数であるが、但し、存在するカルボキシラートイオンは50%までカルボキシエステル残基を形成することができる。

10. mが12以上であり、そしてx+yまたはzが50以下である請求項6記載の組成物。

11. 該有機-無機ハイブリッド型粒子が水性分散体中において平均粒子径50

～600 nmの内のいずれかの径を有し、かつ、多分散度が0.1以下である請求項6記載の組成物。

12. 該有機－無機ハイブリッド型粒子が、該粒子の総重量当たり、  
ブロック共重合体を30～70重量%、

5 ヒドロキシアパタイトを25～65重量%、および  
生物活性物質を0.1～15重量%

を含んでなる請求項6記載の組成物。

13. 生物活性物質がポリ－もしくはオリゴヌクレオチドおよびポリ－もしくはオリゴペプチドからなる群より選ばれる請求項6記載の組成物。

10 14. 該有機－無機ハイブリッド型粒子を含んでなる組成物が水性分散体の形態にある請求項6記載の組成物。

15. 該有機－無機ハイブリッド型粒子を含んでなる組成物が凍結乾燥された形態にある請求項6記載の組成物。

16. (A) 生物活性物質、カルシウムイオンおよび必要により緩衝剤を含む第一の水溶液を調製する段階、独立して、

(B) 一般式(I)

PEG-block-ポリ(carbo) (I)

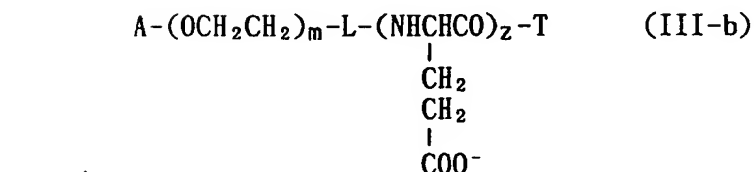
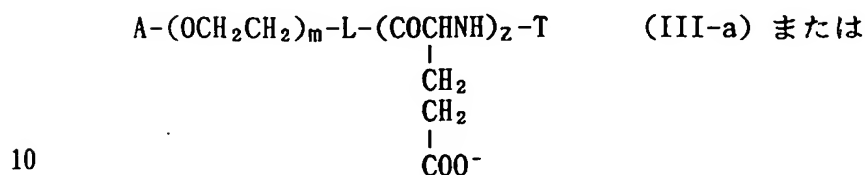
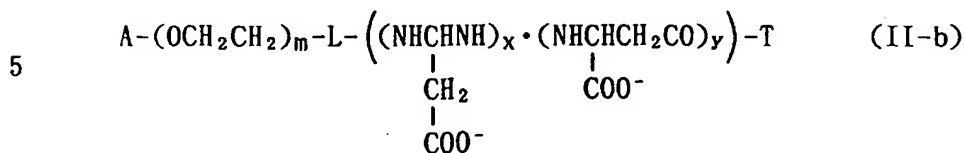
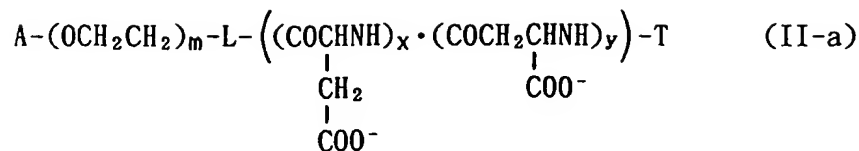
(式中、PEGはポリエチレングリコールセグメントを示し、そして carbo は側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す)

20 で表される構造を含んでなるブロック共重合体、リン酸イオンおよび必要により緩衝剤を含む第二の水溶液を調製する段階、次いで

(C) 前記第一の水溶液と第二の水溶液を、ヒドロキシアパタイトが生成するのに十分な条件下で混合する段階、

を含んでなる請求項6記載の組成物の調製方法。

25 17. 生物活性物質がポリ－もしくはオリゴヌクレオチドおよびポリ－もしくはオリゴペプチドからなる群より選ばれ、ブロック共重合体が、下記一般式(II-a)、(II-b)、(III-a)および(III-b)のいずれか一つで表される請求項10記載の調製方法：



15 各式中、各記号はそれぞれ独立した意味を有し、そして

Aは水素原子または置換もしくは未置換の炭素原子12個までのアルキル基を表し、

Lは単結合、NH、COまたはX(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>Yであって、ここでXはOCO、CONH、NHCO、NHCOO、NHCONH、CONHもしくはCOOを表し、YはNHもしくはCOを表し、pは1～6の整数を表し、

Tは水素原子、ヒドロキシル基または-ZRであって、ここでZは単結合、CO、OもしくはNHを表し、Rは置換もしくは未置換の炭素原子12個までの炭化水素基を表し、

mは4～2500の整数であり、そして

25 x+yまたはzは5～300の整数であるが、但し、存在するカルボキシラートイオンは50%までカルボキシエステル残基を形成することができる。

18. (A) 一般式(I)

PEG-block-ポリ(carbo) (I)

(式中、PEGはポリエチレングリコールセグメントを示し、そして carbo は

側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す)

- で表される構造を含んでなるブロック共重合体、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ )、リン酸イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) およびを生物活性物質から生成される該生物活性物質を担持する有機-無機ハイブリッド型粒子を含んでなり、かつ、該粒子の平均粒子径が50~600 nmであり、該生物活性物質がポリ-もしくはオリゴヌクレオチドである水性分散体を、動物細胞の培養物中に添加する段階、ならびに
- (B) (A) で調製された培養物をインキュベーションする段階、を含んでなる in vitroでの細胞内へのポリ-もしくはオリゴヌクレオチドの導入方法。

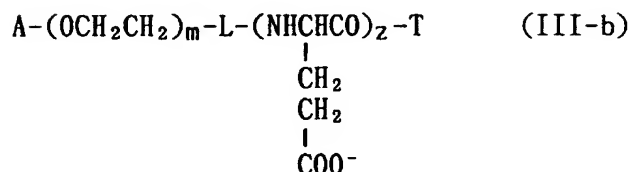
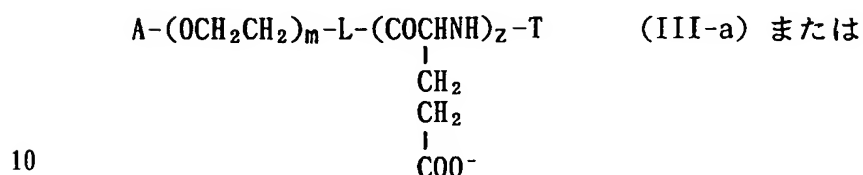
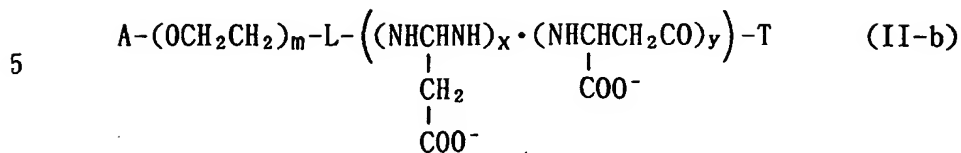
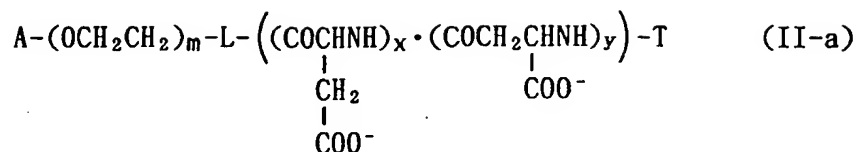
#### 10 19. (a) 一般式 (I)

PEG-block-ポリ(carbo) (I)

(式中、PEGはポリエチレングリコールセグメントを示し、そして carbo は側鎖にカルボキシラートイオンを有する繰り返し単位を示す)

- で表される構造を含んでなるブロック共重合体、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ )、
- 15 リン酸イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) およびを生物活性物質から生成される該生物活性物質を担持する有機-無機ハイブリッド型粒子を含んでなり、かつ、該粒子の平均粒子径が50~600 nmであり、該生物活性物質がポリ-もしくはオリゴヌクレオチドである水性分散体を、該ヌクレオチドの導入が望まれる動物の適当な部位に注入する段階、ならびに
- 20 (b) 該当な部位もしくはその近傍に存在する細胞内へ該ヌクレオチドを導入する段階を含んでなる in vivoでの細胞内へのポリ-もしくはオリゴヌクレオチドの導入方法。

- 20 20. 下記一般式 (II-a)、(II-b)、(III-a) および (III-b) のいずれか一つで表されるブロック共重合体の存在する水溶液中で、カルシウムイオンとリン酸イオンとを使用するが、ヒドロキシアパタイトを生成するのに必要な当量比を超えた過剰なカルシウムイオンを使用して反応させる段階を含んでなる平均粒径が50~600 nmの有機-無機ハイブリッド型粒子を含む分散体の製造方法:



15 各式中、各記号はそれぞれ独立した意味を有し、そして

Aは水素原子または置換もしくは未置換の炭素原子12個までのアルキル基を表し、

Lは単結合、NH、COまたは $X(CH_2)_pY$ であって、ここでXはOCO、CONH、NHCO、NHCOO、NHCONH、CONHもしくはCOOを表し、YはNHもしくはCOを表し、pは1～6の整数を表し、

Tは水素原子、ヒドロキシル基または $-ZR$ であって、ここでZは単結合、CO、OもしくはNHを表し、Rは置換もしくは未置換の炭素原子12個までの炭化水素基を表し、

mは4～2500の整数であり、そして

25  $x+y$  または  $z$  は5～300の整数であるが、但し、存在するカルボキシラートイオンは50%までカルボキシエステル残基を形成することができる。



Fig. 1

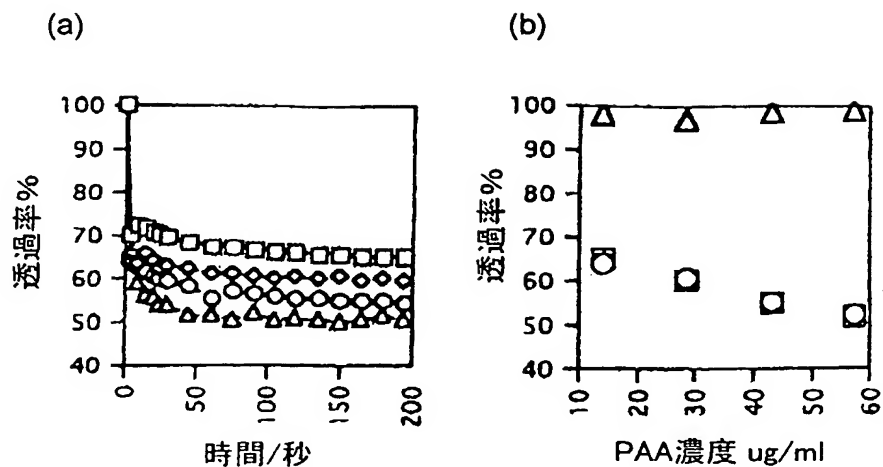


Fig. 2

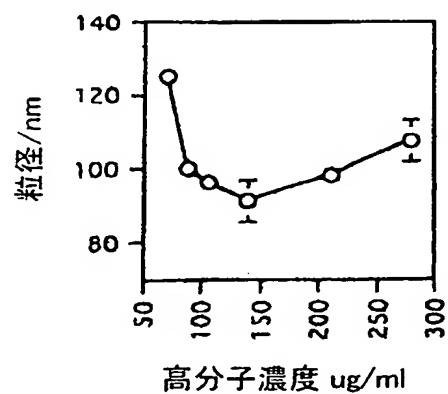


Fig. 3

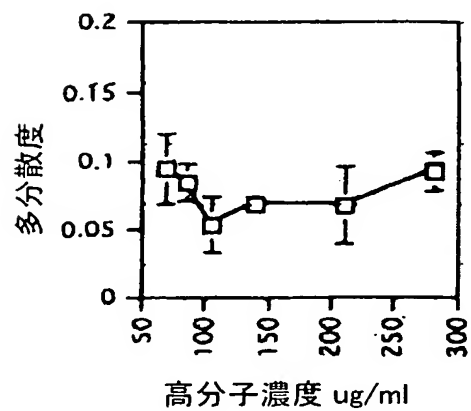


Fig. 4

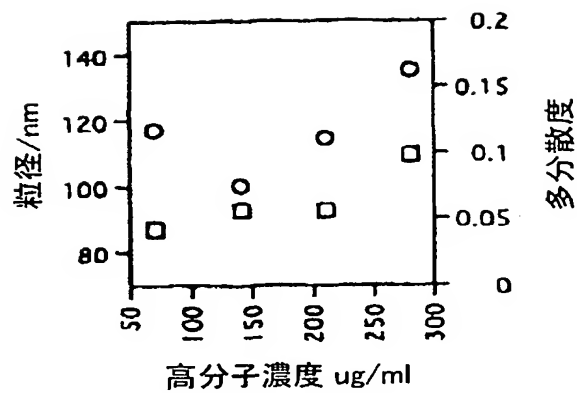
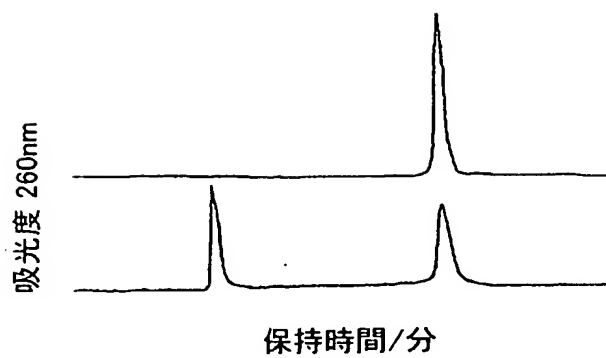
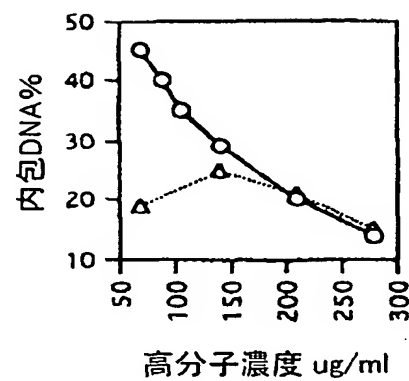


Fig. 5

(a)



(b)



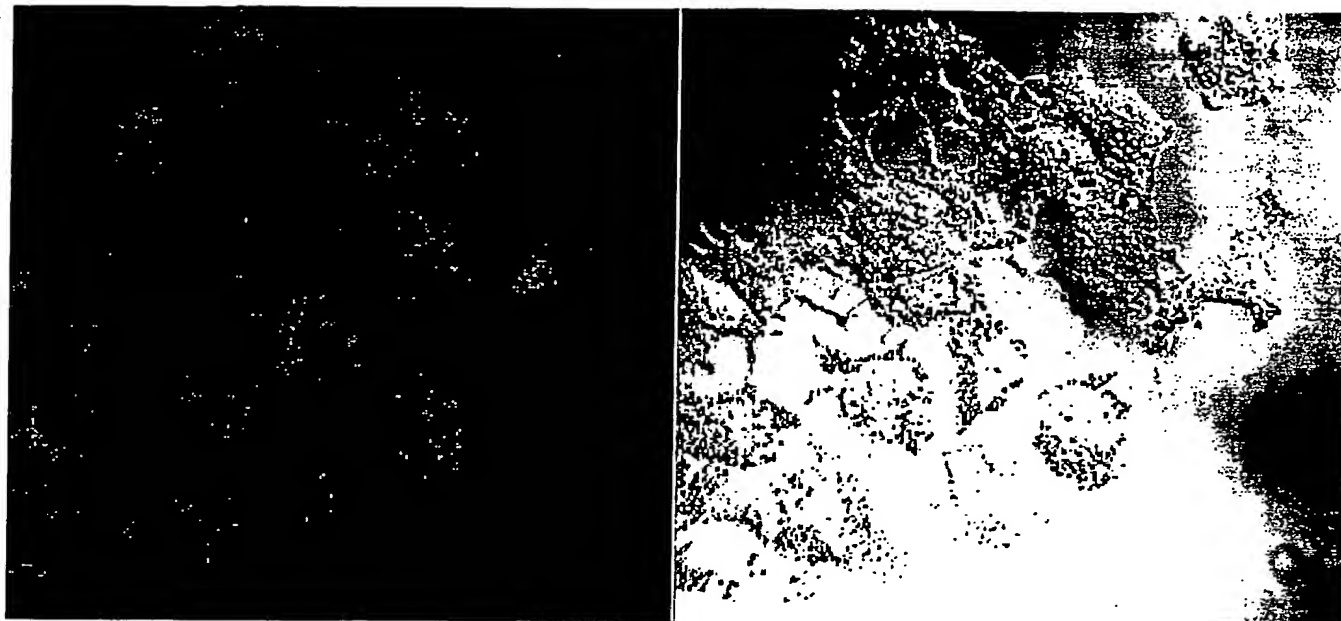
# Fig. 6

共焦点顕微鏡像

A

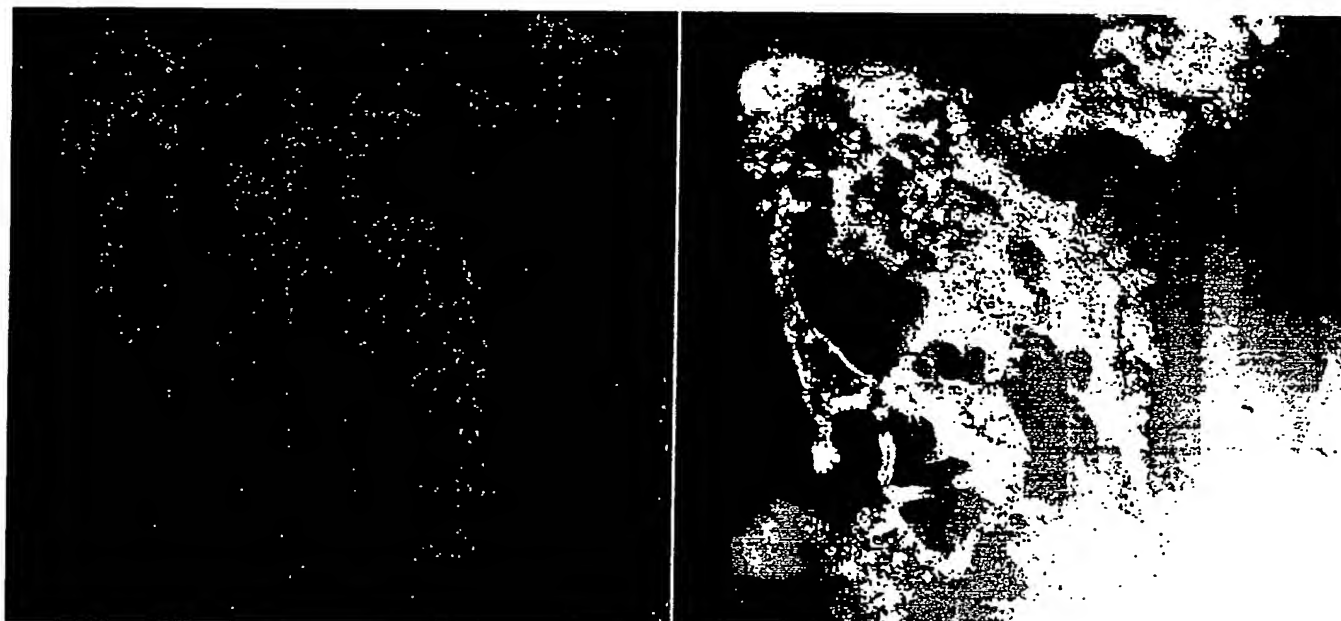
蛍光像

明視野像



DNAのみ

B



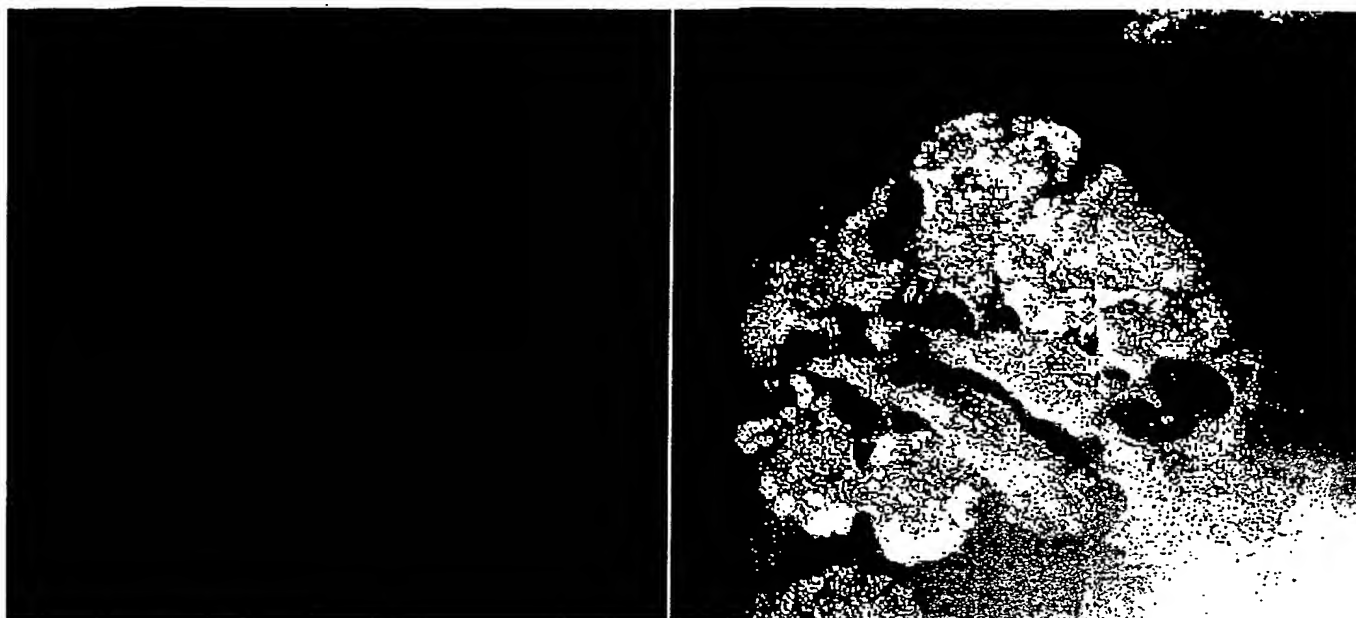
CaP沈殿 (PEG-PAA 70ug/mL)

## Fig. 7

蛍光像

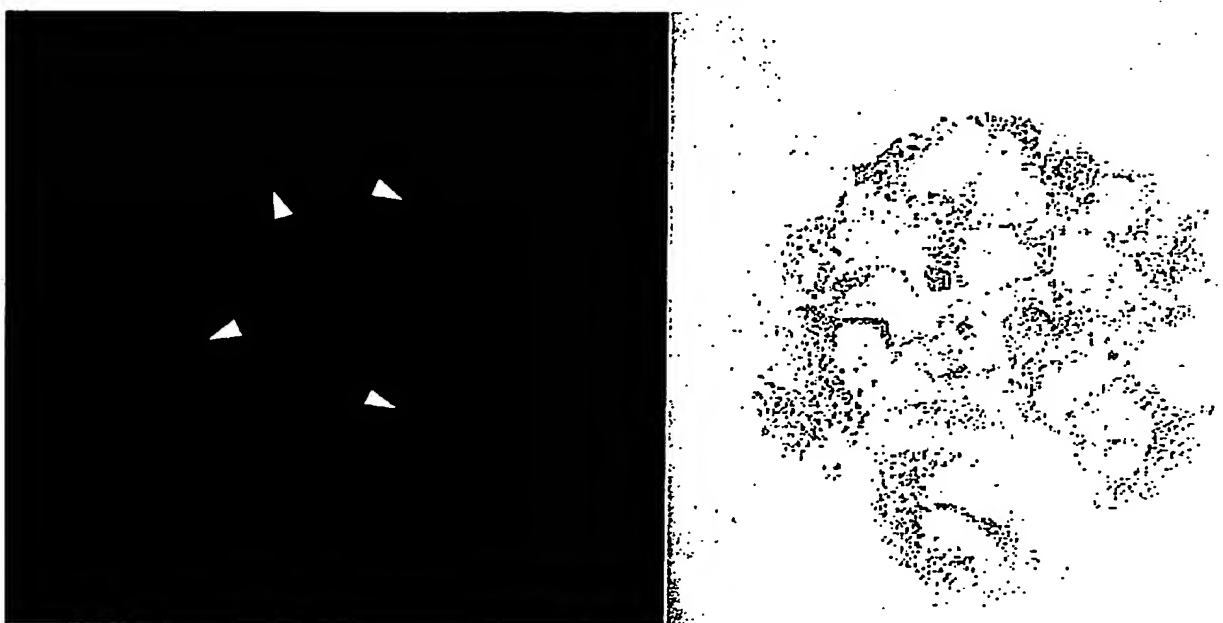
明視野像

C



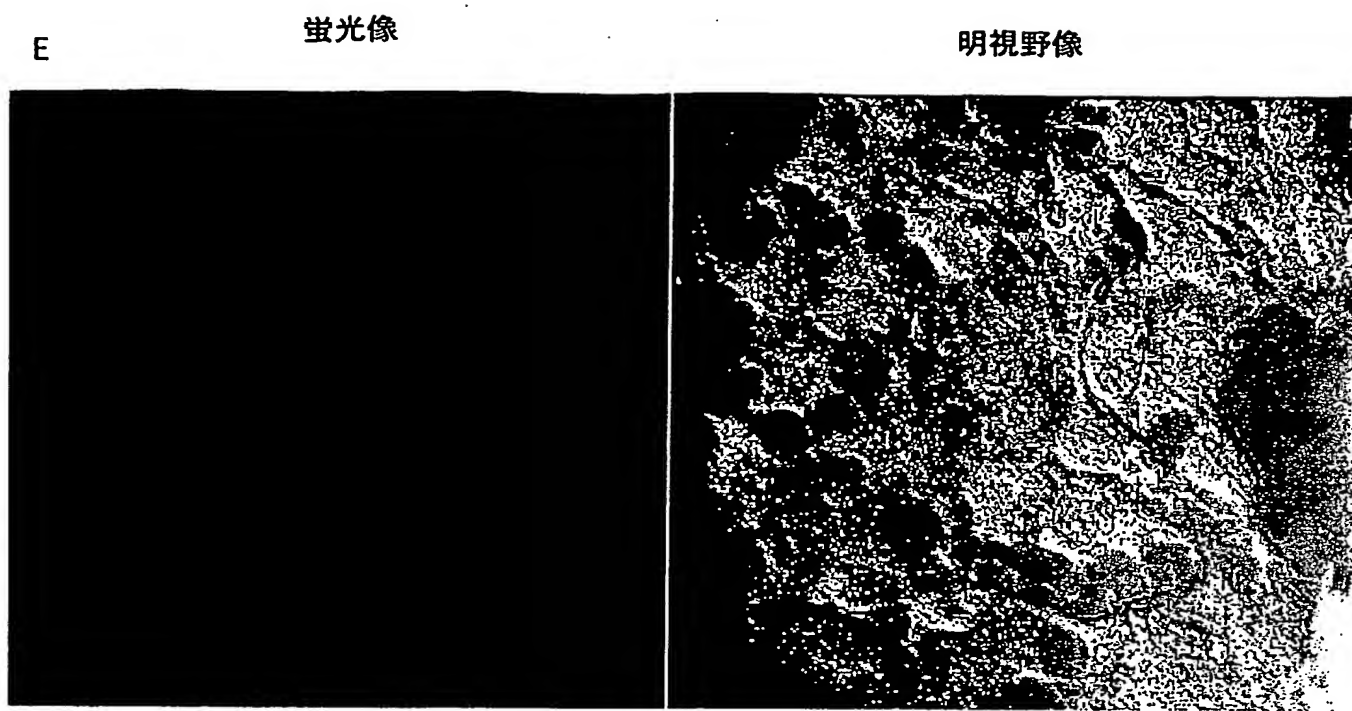
CaP粒子 (PEG-PAA 280 ug/ml)  
poly(methacrylic acid)非共存下

D



CaP粒子 (PEG-PAA 280 ug/ml)  
poly(methacrylic acid)共存下  
矢印：核

Fig. 8



蛍光分子ローダミンのみ

Fig. 9

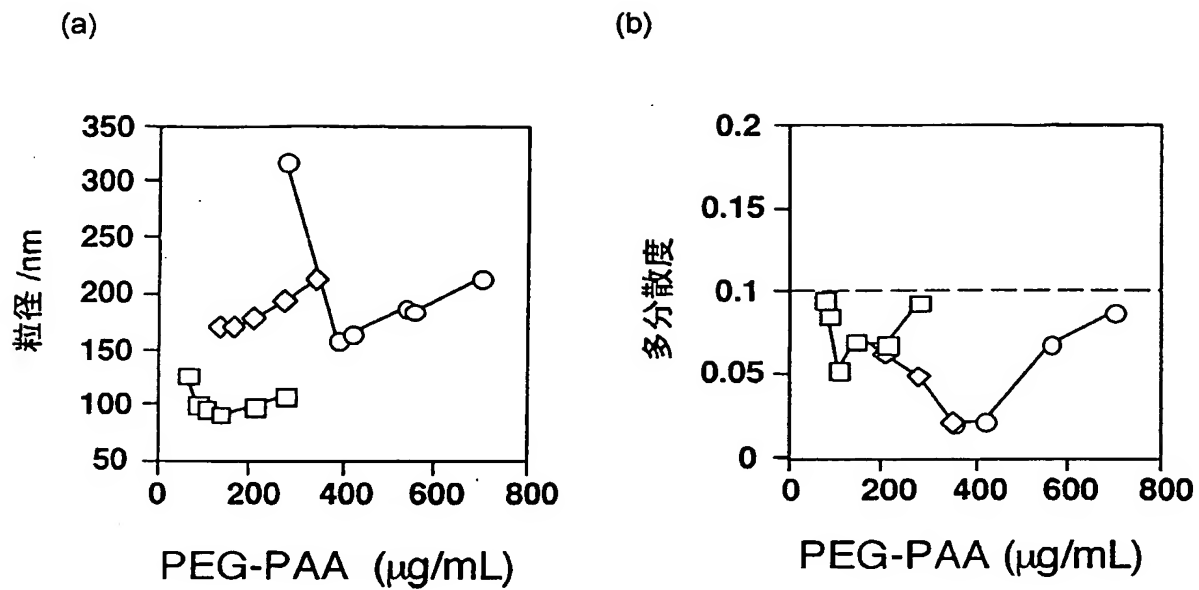


Fig. 10

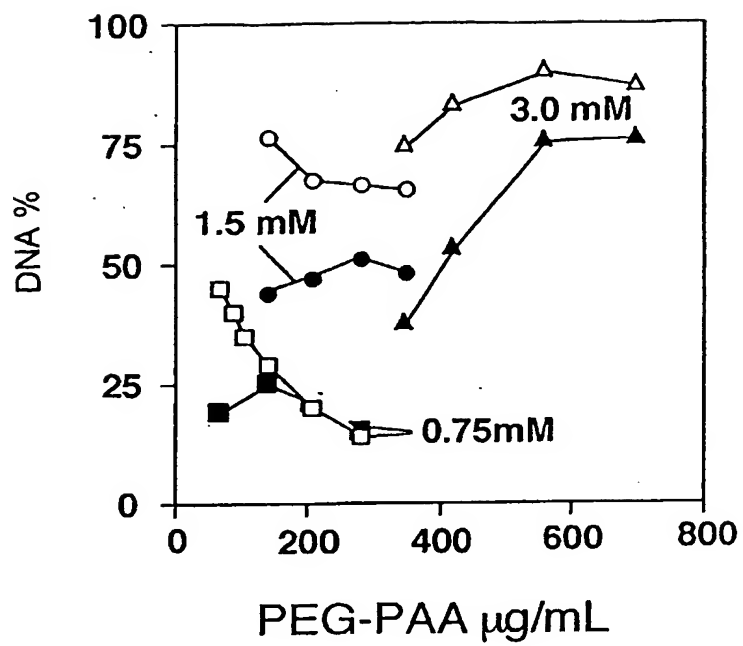


Fig. 11

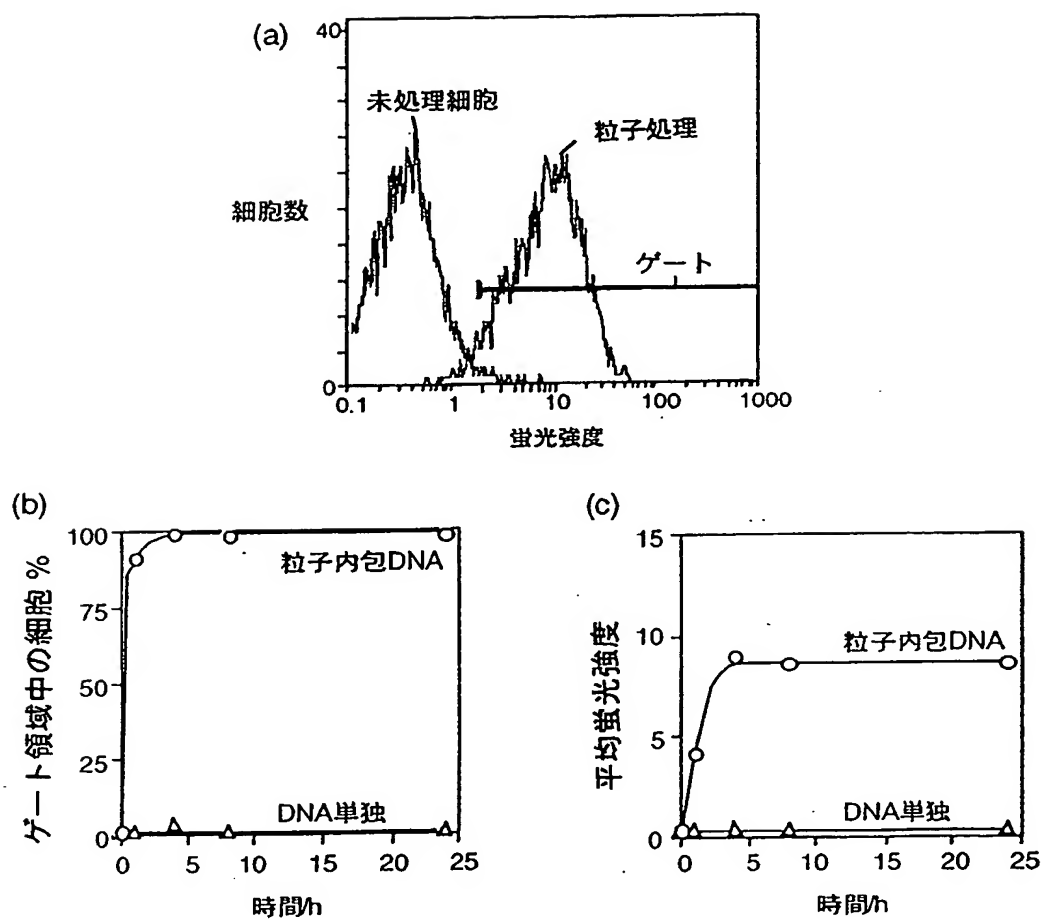




Fig. 12

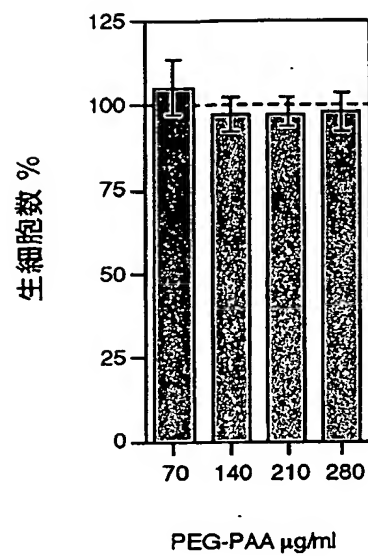
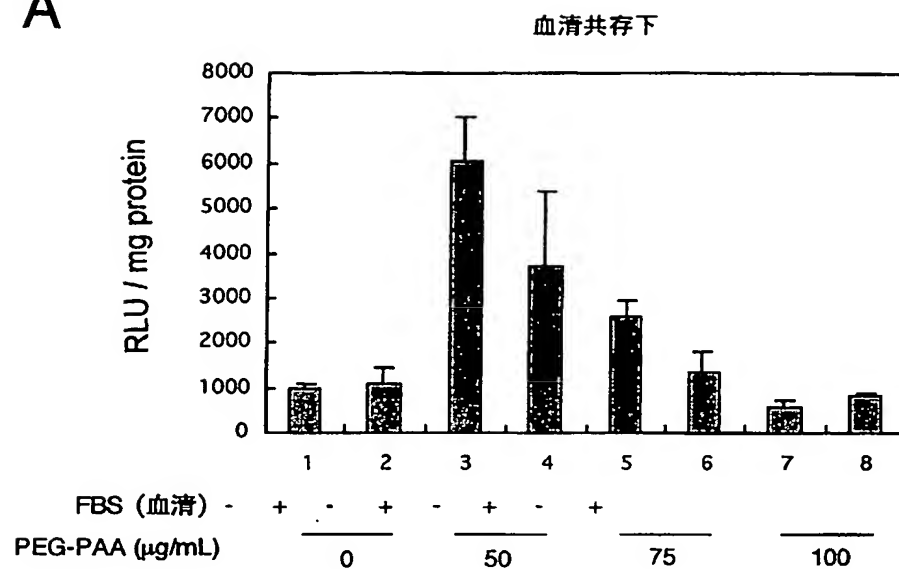
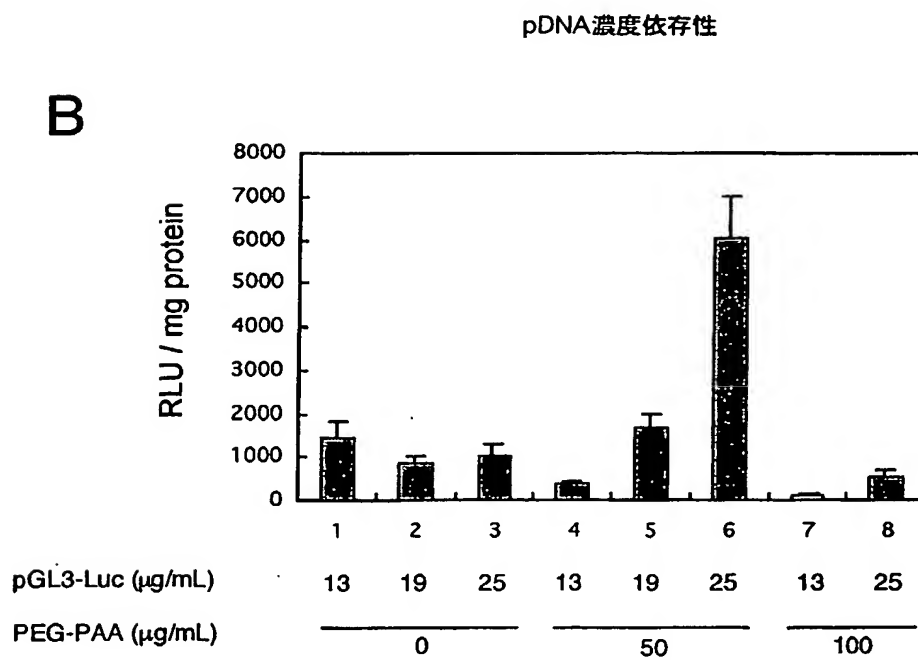


Fig. 13

A



B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08619

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C08L77/00, C08G69/44, A61K47/30, A61K47/48, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C0877/00-77/12, C08G69/44, C08L71/02, C01B25/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Yasunori KAKIZAWA et al., "Block Kyojugotai to DNA kara naru Jiko Soshikika Ryushi no Sosei to sono Saibonai DNA Donyu System eno Tenkai", Polymer Preprints, Japan, 28 August, 2001 (28.08.01), Vol.50, No.14, pages 3818 to 3819	1-20
A	JP 5-17111 A (Ricoh Co., Ltd.), 26 January, 1993 (26.01.93), Claims (Family: none)	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November, 2002 (11.11.02)

Date of mailing of the international search report

26 November, 2002 (26.11.02)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C08L77/00、C08G69/44、A61K47/30、A61K47/48、 A61P43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C0877/00-77/12、C08G69/44、C08L71/02、C01B25/32		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1926-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2002年 日本国登録実用新案公報 1994-2002年 日本国実用新案登録公報 1996-2002年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JICST 科学技術文献ファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	柿澤資訓他, ブロック共重合体とDNAからなる自己組織化粒子の 創製とその細胞内DNA導入システムへの展開, 高分子学会予稿 集, 2001. 08. 28, 第50巻, 第14号, p. 3818- 3819	1-20
A	JP 5-17111 A (株式会社リコー) 1993. 01. 26, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-20
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 11. 11. 02	国際調査報告の発送日 26.11.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小出 直也	4 J 3041
電話番号 03-3581-1101 内線 3455		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**